

Date: February 10, 2004 Label No. EV369584335US I hereby certify that, on the date indicated above, I deposited this paper with identified attachments and/or fee with the U.S. Postal Service and that it was addressed for delivery to the Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 by "Express Mail Post Office to Addressee" service.

Stephanie Hill Stephanie Hill
Name (Print) Signature

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:	WADA et al.)	Examiner: Unassigned
)	
Application No.:	Unassigned)	Group Art Unit: Unassigned
)	
Filed:	February 10, 2004)	Confirmation No.: Unassigned
)	
Docket No.:	3190-051)	Customer No.: 33432
)	

For: METHODS FOR MEASURING AND DIAGNOSING ENDOTOXIN, SENSOR THEREFOR, AND METHOD FOR PRODUCING AND REUSING THE SENSOR

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

February 10, 2004

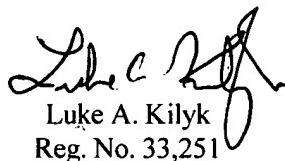
The benefit of the filing date of February 21, 2003 of the following prior Japanese Patent Application is hereby requested for the above-identified application, and the priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed:

Japanese Patent Application No. 2003-043690 filed February 21, 2003.

In support of this claim, the requisite certified copy of said original Japanese Patent Application No. JP2003-043690 is enclosed.

In the event that any fees are due in connection with this paper, please charge such fees to our Deposit Account No. 50-0925.

Respectfully submitted,


Luke A. Kilyk
Reg. No. 33,251

Atty. Docket No. 3190-051
KILYK & BOWERSOX, P.L.L.C.
53 A East Lee Street
Warrenton, VA 20186
Tel.: (540) 428-1701
Fax: (540) 428-1720

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日 2003年 2月 21日
Date of Application:

出願番号 特願2003-043690
Application Number:

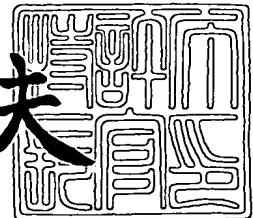
[ST. 10/C] : [JP 2003-043690]

出願人 ニプロ株式会社
Applicant(s):

2003年12月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 NP03-1013

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/50

【発明者】

【住所又は居所】 〒531-8510 大阪市北区本庄西3丁目9番3号
ニプロ株式会社内

【氏名】 和田 匠暁

【発明者】

【住所又は居所】 〒531-8510 大阪市北区本庄西3丁目9番3号
ニプロ株式会社内

【氏名】 末竹 寿紀

【特許出願人】

【識別番号】 000135036

【氏名又は名称】 ニプロ株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088904

【弁理士】

【氏名又は名称】 庄司 隆

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067070

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9901944

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 エンドトキシン測定用センサ、測定方法、診断方法、製造方法
およびセンサ再生方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 エンドトキシン(以下ET)と特異的に結合する能力を有する物質を
金属薄膜担体に固定化したことを特徴とする、表面プラズモン共鳴(以下SPR)を
用いてET測定するためのセンサ(以下ET測定用センサ)。

【請求項 2】 ETと特異的に結合する能力を有する物質が、ポリミキシンB(以
下PMX)又は抗ET抗体である請求項 1 に記載のセンサ。

【請求項 3】 担体が、金薄膜である請求項 1 又は 2 に記載のセンサ。

【請求項 4】 請求項 1 ~ 3 の何れか一に記載のセンサを、測定試料と接触させ
た後にSPRによってETを測定する方法。

【請求項 5】 測定試料と接触後、さらに抗ET抗体又はPMXを反応させた後にSPR
によってETを測定する請求項 4 に記載のETを測定する方法。

【請求項 6】 抗ET抗体もしくはPMXを反応させた後に、さらに抗ET抗体に対し
てもしくはPMXに対して反応性を持つ抗体、又は修飾化されたこれらの抗体を反
応させた後にSPRによってETを測定する請求項 4 に記載のETを測定する方法。

【請求項 7】 ETが、Lipopolysaccharides(以下LPS)、内毒素、リポ多糖、發
熱物質、又はバイロジエンである請求項 4 ~ 6 の何れか一に記載のETを測定する
方法。

【請求項 8】 測定試料が、生体試料、培養液、血液透析液及びその廃液、注射
用水、医薬品、純水から選ばれる請求項 7 に記載のETを測定する方法。

【請求項 9】 請求項 8 のETを測定する方法による細菌感染症の診断方法。

【請求項 10】 請求項 7 のETを測定する方法によるET夾雜の判定方法。

【請求項 11】 請求項 4 ~ 8 の何れか一に記載の測定が完了した後、ET測定用
センサから捕捉されたETを溶出することが可能な再生液を接触させて、ET測定用
センサを再生させるET測定用センサの再生方法。

【請求項 12】 請求項 1 ~ 3 のET測定用センサの製造方法。

【請求項 13】 請求項 1 ~ 3 の何れか一に記載のセンサ、請求項 4 ~ 8 の何れ

か一に記載の測定方法に使用する試薬、及び請求項11に記載の再生に使用する試薬の少なくとも1を含むET測定のためのセンサ又は試薬。

【請求項14】請求項4～8の何れか一に記載のSPRによってETを測定する方法に使用するSPR用担体チップ（SPR測定用センサーチップ）の用途。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はエンドトキシン（以下ETという）の測定に使用するセンサ、及びそのセンサを使ったETの測定方法に関する。さらには、測定したET値より、測定試料を判定する方法、及び測定後のセンサの再生方法に関する。特に、本発明のETの測定は、表面プラズモン共鳴（以下SPRという）法によるものである。

【0002】

【従来技術】

ETは、大腸菌、コレラ、緑膿菌、サルモネラ、赤痢菌などの出すリポ多糖の高分子複合体で細菌菌体の構成成分であって細胞の破壊により遊離される。その作用は、毒性は比較的弱く、強い発熱性、耐熱性、腫瘍細胞への破壊作用等が特徴ある性質である。

医薬品や血液に直接接触する医療用具がETで汚染された場合、ごく微量でも重篤な結果を招くことがあり、これらのET汚染量は厳密に管理されなければならず、米国や日本の薬局方にもET試験法が収載されている。また、グラム陰性菌感染による敗血症の早期診断、グラム陰性菌感染症の治療効果及び予後の判定のため、血中のETを定量する試みも行われている。

このようにETは様々な分野で関心が持たれ種々のETを測定する手法が提案されてきた。

【0003】

ETを測定する手法として、従来、ウサギ発熱試験、鶏胚致死試験、ラジオイムノアッセイ、ガスマススペクトル、リムルステストがあり、これらの中で最も鋭敏、簡便かつ迅速なのはリムルステストであり、医薬品、水、透析液などの汚染試験、臨床検査などで使用されている。

このリムルステストを用いたET測定法は、カブトガニの血球抽出液(ライセート)にETが加わると、C因子(ET感受性因子)が活性化され、それに続く連鎖的酵素反応がそれぞれ別の経路によって順次惹起され、最終的に活性化された凝固酵素が反応基質を加水分解することを利用した方法である。一般的には、1)ETとライセート中のC因子系反応によって最終的に活性化された凝固酵素が、そのプロテアーゼ活性により、コアグロゲンをコアグリンに変換してゲル化させる過程で生じる濁度変化を光学分析装置により測定する比濁法と、2)ETとライセート中のC因子系反応によって最終的に活性化された凝固酵素が、そのプロテアーゼ活性により、コアグロゲンをコアグリンに変換する際のコアグロゲンの水解部位のアミノ酸配列と類似の配列を持つ合成ペプチドに、発色基p-ニトロアニリン(pNA)を結合させた発色合成基質を用い、凝固酵素のアミダーゼ活性によって遊離するpNAの吸光度を測定する比色法の2種類が使用されている。

しかし、従来のリムルステストを用いたET測定は、用手法であるため、測定者間により、測定値のばらつきが生じ、また、測定毎にセンサが必要になるなどの問題点があった。

【0004】

さらにリムルステストの改良として β -1, 3-グルカナーゼを含んでなるET測定用試薬（特許文献1）、比濁時間分析法を利用したETの測定方法（特許文献2）、或はET吸着体を用いた測定方法（特許文献3）等も提案されている。その他、ET活性を中和する物質としてポリミキシンB(以下PMXという)が知られておりその相互作用をSPRで分析する方法が報告されている（非特許文献1及び2）

【0005】

【先行文献】

【特許文献1】特開平11-178599

【特許文献2】特開平8-211063

【特許文献3】特開平2-193072

【非特許文献1】FEBS Letters 445(1999)420-424

【非特許文献2】J.B.C. 274(42) 29624-29627(1999)

【0006】

【発明が解決しようとしている課題】

本発明の課題は、リムルステストに代わる新規なETの測定法を提供するものである。つまり測定手法としてSPRを利用することで、測定における機械化を達成し、容易にETの測定法を提供しようとするものである。ET活性を中和する物質としてPMXが知られておりその相互作用をSPRで分析する方法が前記非特許文献1及び2によって公知であったが、この方法では大量の測定試料から迅速に容易にETを測定する手段を開示も示唆もしていない。

【0007】**【課題を解決する方法及び手段】**

本発明者らは、SPRを使ってETを測定する際に、PMX等のETを特異的に吸着する能力を有する物質をSPR測定用担体上に固定化しておき、それを測定用センサとして用いれば測定試料からETを極めて容易に迅速に測定可能であり、さらに測定後センサを再生して繰り返し測定できることを見出し本発明を完成した。

【0008】

すなわち、本発明は、以下よりなる。

- 1．エンドトキシン(以下ET)と特異的に結合する能力を有する物質を金属薄膜担体に固定化したことを特徴とする、表面プラズモン共鳴(以下SPR)を用いてET測定するためのセンサ(以下ET測定用センサ)。
- 2．ETと特異的に結合する能力を有する物質が、ポリミキシンB(以下PMX)又は抗ET抗体である前項1に記載のセンサ。
- 3．担体が、金薄膜である前項1又は2に記載のセンサ。
- 4．前項1～3の何れか一に記載のセンサを、測定試料と接触させた後にSPRによってETを測定する方法。
- 5．測定試料と接触後、さらに抗ET抗体又はPMXを反応させた後にSPRによってETを測定する前項4に記載のETを測定する方法。
- 6．抗ET抗体もしくはPMXを反応させた後に、さらに抗ET抗体に対してもしくはPMXに対して反応性を持つ抗体、又は修飾化されたこれらの抗体を反応させた後にSPRによってETを測定する前項4に記載のETを測定する方法。
- 7．ETが、Lipopolysaccharides(以下LPS)、内毒素、リポ多糖、発熱物質、又

はパイロジエンである前項4～6の何れか一に記載のETを測定する方法。

8. 測定試料が、生体試料、培養液、血液透析液及びその廃液、注射用水、医薬品、純水から選ばれる前項7に記載のETを測定する方法。

9. 前項8に記載のETを測定する方法による細菌感染症の診断方法。

10. 前項7に記載のETを測定する方法によるET夾雜の判定方法。

11. 前項4～8の何れか一に記載の測定が完了した後、ET測定用センサから捕捉されたETを溶出することが可能な再生液を接触させて、ET測定用センサを再生させるET測定用センサの再生方法。

12. 前項1～3に記載のET測定用センサの製造方法。

13. 前項1～3の何れか一に記載のセンサ、請求項4～8の何れか一に記載の測定方法に使用する試薬、及び請求項11に記載の再生に使用する試薬の少なくとも1を含むET測定のためのセンサ又は試薬。

14. 前項4～8の何れか一に記載のSPRによってETを測定する方法に使用するSPR用担体チップ（SPR測定用センサーチップ）の用途。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明のET測定用センサは、PMX等のETを特異的に吸着する能力を有する物質をSPR測定用担体上に固定化して調製される。

【0010】

本発明のSPRの手段は、前記非特許文献1に詳しい。そして、そのSPR測定用担体（SPR測定用センサーチップ）も公知であり、広く市販されている。本発明では、このSPRの技術及びSPR測定用担体を利用し、援用する。このSPRの技術及びSPR測定用担体の系としては現在ビアコア(BIACORE)社のバイオセンサーが効果的に利用可能であるが、これに限定されるものではない。SPR測定用担体としては、種々のグレイドのセンサーチップが市販されており、これらを利用できる。例えばCM5センサーチップを実施例では例示した。

【0011】

ETと特異的に結合する能力を有する物質は、PMX又は抗ET抗体が好適であるが、特異的にETとの結合能力を有する限りこれらに限定されない。たとえば、ヒス

チジン、ヒスタミンおよびアデニンから選ばれる含窒素複素環式化合物も利用可能である。PMXは市販されており、それをそのまま或は精製して使用可能である。抗ET抗体は、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を適宜公知の手法により調製可能であるが、これらも市販されているので容易に入手可能である。例えば、抗ET抗体はナノツール社 (Nanotools Antikorpertechnik:独)、キュイーティー社 (QED Bioscience, Inc.:米)、標識抗ET抗体はバイオジエネシス社(Biogenesis LTD.:英)がある。なお、ETは多様な呼び名で一般的に呼称されるが、LPS、内毒素、リポ多糖、発熱物質、パイロジエン等が対象であり、抗体を作るためにはこれらを適当なアジュバントと共に動物に投与し調製するか、さらにその後ハイブリドーマの調製技術によって調製可能である。

【0012】

SPR測定用担体とETと特異的に結合する能力を有する物質の結合は、直接又はスペーサーを介して行われる。スペーサーとしては、チオール基やジチオール基を有する化合物による単分子層膜や、カルボキシメチルデキストラン、ストレプトアビシン、チオールアルカン等が挙げられるがこれに限らない。ETと特異的に結合する能力を有する物質の、SPR測定用担体に対する結合量は、1.0-2.5ng/mm²で固定化することが好適である。

【0013】

本発明のET測定用センサは、予めSPR測定用担体とETと特異的に結合する能力を有する物質の固定化されたものをセンサとして提供してもよいが、用時調製用に、SPR測定用担体、ETと特異的に結合する能力を有する物質及びSPR測定用担体から選ばれる少なくとも2つをキット化して提供することも可能であるし、SPR測定用担体自体をSPRを利用するET測定方法に使用する用途を目的として提供可能である。

【0014】

本発明のセンサを使ったETの測定の測定試料は、ETが夾雜する可能性ある対象物である限り特に限定されない。血液や尿などの生体試料、培養液、血液透析液およびその廃液、注射用水、医薬品、純水等広く適用可能である。なお、脂質成分中のET測定には、予め界面活性剤等による前処理を必要とするが、いずれも測

定試料が液体化している限り、好適に測定にふすことが出来る。測定対象のETは、LPS、内毒素、リポ多糖、発熱物質、バイロジエン等が本質的に同等物として検出できる。センサは、測定試料と接触させて測定試料中のETを選択的に捕捉し、捕捉されたET値をSPR測定によって定量的におこなう。

【0015】

測定試料とセンサの接触時の混合比は、センサに対して測定試料30-900 μ lを2-60分、好ましくは測定試料90-360 μ lを6-24分かけて接触させることで行う。

【0016】

微量測定試料の測定のためには、測定試料とセンサの接触後、捕捉されたETに対してさらに抗ET抗体又はPMXを反応させた後にSPR測定を行うことにより測定感度の上昇が確認された。添加量は、約50-300 μ l（抗ET抗体の場合その濃度が約5-300 μ g/mlに調整した溶液、PMXでは約0.05-1 μ g/mlに調整した溶液）である。

【0017】

さらに、より一層の測定感度の上昇を得るためにには、前記抗ET抗体もしくはPMXを反応させた後に、さらに抗ET抗体に対してもしくはPMXに対して反応性を持つ抗体、又は修飾化されたこれらの抗体を反応させ、その後にSPR測定を行うことはより高感度にETを測定することが可能である。ここで抗ET抗体に対してもしくはPMXに対して反応性を持つ抗体とは、前者であれば広く市販の抗IgG抗体が利用できる。修飾化されたこれらの抗体とはタンパク質（アルカリフェオスファターゼ、ペルオキシダーゼ、アルブミン等）やデキストラン等の高分子化合物で修飾したコンジュゲート抗体を意味し、修飾には酵素等の抗体の標識化において繁用されている手段をそのまま利用出来る（臨床検査提要 免疫的定量法 金原出版）。抗IgG抗体（約5-300 μ g/ml）の添加量は、約50-300 μ lである。

【0018】

以上のSPRによる測定で、測定試料中のETの増加は、図1に示すような検量線を提供可能であり、ETの定量分析に本発明のセンサ及び測定法は極めて有用であることが確認された。

【0019】

かくして本発明の測定法は、広くETが夾雜している測定試料の測定に応用可能

であり、特に細菌感染症の診断方法、ET夾雜判定法等（血液や尿などの生体試料、培養液、血液透析液およびその廃液、注射用水、医薬品、純水等）に好適に利用出来る。

【0020】

本発明にあっては、以上のようにET測定用センサを使ってETの測定完了後さらに再生処理により再使用可能であるという利点をもつ。再生処理とは、ET測定用センサによって測定試料中から捕捉されたETを、該センサから溶離することをいい、溶離によって該センサが使用前の状態にもどることをいう。再生処理のためには、以下のような再生液を十分量接触させることによって可能であり、約10回程度まで、所望の感度をもって再使用可能である。

再生液は、アルカリ性溶液、酸性溶液、もしくは界面活性剤を含む溶液であれば良く、アルカリ性溶液としては、NaOH、KOH、Na₂CO₃、NaHCO₃、NaOAc、KOAcなどの水溶液が挙げられ、酸性溶液はHCl、AcOH、NH₄Cl、グリシン、クエン酸などの水溶液が挙げられる。界面活性剤としては、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルやポリオキシエチレンアルキルフェノールエーテルに代表される非イオン性界面活性剤、デオキシコール酸に代表される胆汁酸類の界面活性剤、ドデシル硫酸ナトリウムに代表される陰イオン界面活性剤であればよく、また、界面活性剤をアルカリ性水溶液もしくは酸性水溶液に含有させてもよい。使用量は、界面活性剤を0.001-0.5%含有した1-20mMのアルカリ溶液が好適に例示される。

【0021】

以上の説明から明らかなように、本発明からなるET測定用センサは、その測定に使用する或はその再生に使用する各種試薬及び/又は溶液を組合わせてキット化し、ETの測定のために、或はET測定用センサの再生のために提供可能である。

【0022】

【実施例&実験例】

以下に本発明を実施例及び実験例により詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではなく、SPRを使ってETを測定する際に、ETを特異的に吸着する能力を有する物質をSPR測定用担体上に固定化しておき、それをSPR測定用セン

サとして用いる限り全て本発明の技術思想に包含される。

【0023】

【実施例1】

ET測定用センサ（ET測定用センサチップ）の調製

SPRの測定には、表面プラズモン共鳴測定装置(BIACORE)を使用し、SPR測定用担体（センサチップ）としてSensor Chip CM5(BIACORE社製品)を用いた。ランニングBufferとしてHBS-EP(BIACORE製品)を用い、センサチップ表面の活性化剤である、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドヒドロクロリド(37.5mg/ml)、N-ヒドロキシスクシンイミド(5.75mg/ml)を含む溶液を流しセンサチップを活性化した。その後、10mg/mlのPMXを含むpH4.5酢酸水溶液の360μlを流し、センサチップ(1-1.2mm²)と24分間接触させ、PMXを固定化し、最後に、1Mエタノールアミン-HCl水溶液(BIACORE社製品)の180μlを加えて、ブロッキングを行い、ET測定用センサチップ（ET測定用センサ）とした。

【0024】

【実験例1】（ET高濃度の測定）

測定対象物となるETとして、LPS(SIGMA)を用いた。実施例1で調製したET測定用センサチップを使った。10mM HEPES、150mM NaCl、及び3.4mM EDTAを含む溶液を、ET除去フィルタによりろ過してランニングBuffer(pH7.4)とした。測定試料溶液は、LPSをこのランニングBufferに溶解し調整し、ET測定を行った。LPS水溶液180μlを12分間流したところ、得られた測定値は、LPS濃度に比例しており、10ng/ml以上の測定が可能であった。

【0025】

【実験例2】（ET低濃度の測定）

実験例1のET測定の操作において、測定対象物をえた後、anti-ET抗体(nano Tools)の濃度が10μg/mlになるようにランニングBufferを用いて調製したanti-ET抗体溶液180μlを、12分間かけてえた後に得られる測定値は、LPS濃度に比例しており、10pg/ml以上の測定が可能であった（図1）。

【0026】

【実験例3】（ET低濃度の測定）

実験例2のET測定の操作において、anti-ET抗体溶液を加えた後、さらに、二次抗体(anti-Mouse IgG AP conjugate(SIGMA))を100倍希釈した溶液 $180\mu l$ を12分間加えた。この二次抗体を流した後に得られるシグナルは、LPS濃度に比例し、 1pg/ml 以上の測定が可能であった。二次抗体としては、anti-Mouse IgG AP conjugateを用いた。

【0027】

【実験例4】（再生）

実験例1～3に共通して、LPS等のET濃度の測定操作が終了後、使用済みのET測定用センサチップ（ET測定用センサ）に対して再生液（例えば12mM水酸化ナトリウム+0.05%Tween20）を流すことで、繰り返して実験例1～3の操作を行うことが可能であった。図2は実験例2で 10ng/ml LPS、anti-LPSの添加後、再生液として12mMNaOH+0.05%Tween20を流して再生した後、繰り返しETの測定が可能であることを示した図である。同様に、再生液（12mM水酸化ナトリウム+0.1%Triton X100）を用いた場合には、1回目の測定と2回目の測定によって得られる測定値が約1/2となったが、その後は一定値となり繰り返し測定が可能であった。

【0028】

【発明の効果】

本発明のET測定用センサは、ETと特異的に結合するPMX等をSPR測定用担体（SPRセンサチップ）に固定化したものであり、サンプルにETが含まれている場合、センサチップ上のPMX等によってETが捕捉され、その結果センサ表面の状態が変化することを利用した、ETのSPRによる測定手段を提供するものである。また、本ET測定用センサは、ETの測定終了後に再生液を用いることで、連続測定が可能である。本発明を用いたET測定は簡便で、かつ、連続測定が可能である効果を有する。

【図面の簡単な説明】

【図1】 実験例2でLPS、anti-ETを流した後の、LPS濃度と測定値の関係、及び、実験例3で、さらにanti-Mouse抗体を用いた時のLPS濃度と測定値の関係を示した図である。

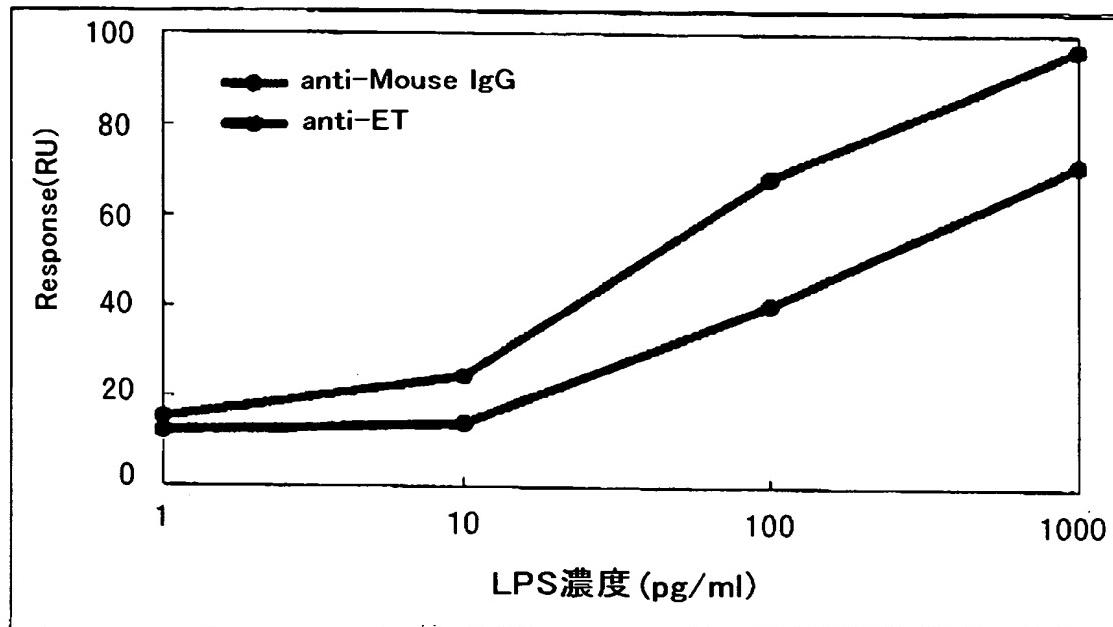
【図2】 実験例2で 10ng/ml のLPS、anti-LPSの添加後、12mMNaOH+0.05%Twee

n20の再生液を流し繰り返し再生した場合の測定値を示す。

【書類名】 図面

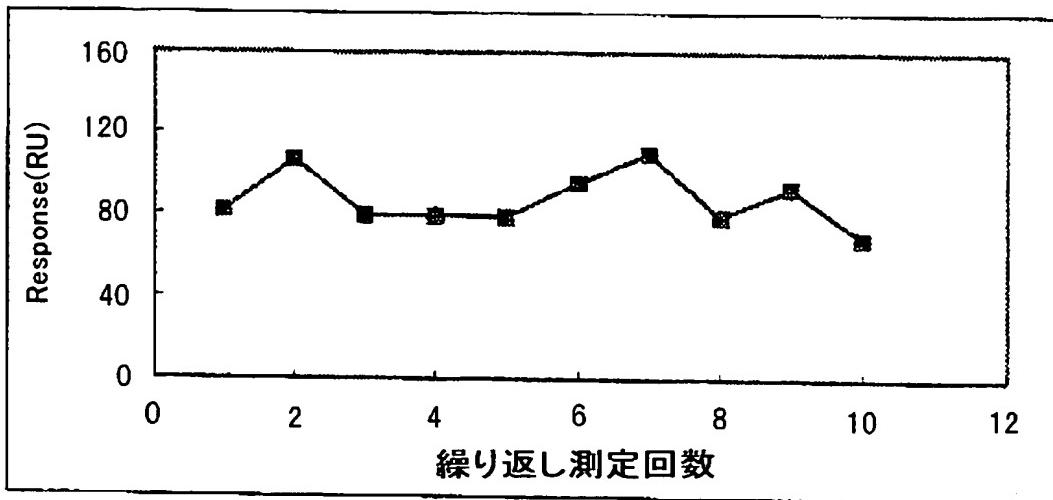
【図1】

図1



【図2】

図2



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明の課題は、リムルステストに代わる新規なエンドトキシン（ET）の測定法を提供するものである。つまり測定手法として表面プラズモン共鳴測定法（SPR）を利用することで、測定における機械化を達成し、さらに高価な試薬を使うことなく容易にETの測定法を提供しようとするものである。

【課題を解決する方法及び手段】 SPRを使ってETを測定する際に、ポリミキシンB等のETを特異的に吸着する能力を有する物質をSPR測定用担体上に固定化しておき、それを測定用センサとして用いれば検体からETを極めて容易に迅速に測定可能であり、さらに測定後センサを再生して繰り返し測定できることを見出し本発明を完成した。

認定・付加情報

特許出願の番号 特願2003-043690
受付番号 50300278643
書類名 特許願
担当官 第一担当上席 0090
作成日 平成15年 2月24日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年 2月21日

次頁無

特願2003-043690

出願人履歴情報

識別番号 [000135036]

1. 変更年月日 2001年 4月 3日

[変更理由] 名称変更

住 所 大阪府大阪市北区本庄西3丁目9番3号
氏 名 ニプロ株式会社